季也蒙毕赤酵母菌尿酸酶基因的克隆、重组表达及表征

饶菁菁[1] 景一娴[1] 邹明月[1] 胡小蕾[1] 廖飞[1] 杨晓兰[1,*]

(1 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆医科大学检验医学院, 重庆，400016)

摘要 **目的：**克隆一种季也蒙毕赤酵母菌的尿酸酶蛋白编码基因，并通过重组表达和表征进行确认。**方法：**测定酵母细胞株 C.G.M.C.C 2.1008 的 rRNA 序列鉴定其所属种，串联质谱分析此天然尿酸酶肽段序列搜索同源蛋白，测定转录组验证其诱导表达属性，据季也蒙毕赤酵母 ATCC 6260 基因组信息推断所得尿酸酶(Uniprot id: A5DFP1)的编码序列设计引物，从 C.G.M.C.C 2.1008 细胞株 cDNA 中 PCR 扩增尿酸酶基因，测序后再克隆至定向表达载体 pDE1 及 pDE2 中构建带 6His 标签的重组表达质粒 pDE1-MGU 和 pDE2-MGU，同时构建无 6His 标签的表达质粒 R-MGU。在大肠杆菌 BL21(DE3)中诱导表达此真菌尿酸酶，SDS-PAGE 和 MALDI-TOF-MS 测定肽段分子量，以尿酸为底物测定其动力学参数及抑制剂敏感性等性质，并与天然尿酸酶进行比较。**结果：**rRNA 序列表明此菌株为季也蒙毕赤酵母，串联质谱分析胰蛋白酶解肽段表明此天然真菌尿酸酶与尿酸酶 A5DFP1 高度相似，转录组测序支持此尿酸酶基因高效诱导表达。用所设计引物经 PCR 从 cDNA 快速获得编码序列，T 载体测序显示其与 A5DFP1 编码序列仅在第 435 位碱基不同但氨基酸仍相同。SDS-PAGE 发现重组 R-MGU 肽段约 35kDa；MALDI-TOF-MS 发现其肽段约 17.43kDa 且与天然酶一致，但按氨基酸序列计算分子量仅 33.98 kDa，表明其可能存在化学修饰。重组表达带 6His 标签尿酸酶纯化后比活性接近 6.0 U/mg；R-MGU 米氏常数、代表抑制剂的抑制常数及分子量与天然尿酸酶无差别，但 R-MGU 很难纯化，使其相同条件下的热稳定性比纯化天然酶略差。**结论：**成功克隆了一种季也蒙毕赤酵母菌的尿酸酶，并实现其活性形式的重组表达。

关键词 季也蒙毕赤酵母尿酸酶 基因克隆 重组表达 表征

中图分类号: Q781 **文献标识码**: [A]

基金项目：国家自然科学基金(Nos. 201402108, 31570862 和 81773625).

supported by the National Natural Science Foundation of China (no. 21402108, 31570862 and 81773625).

通讯作者：杨晓兰(E-mail:xiaolanyang666@yeah.net)

血清尿酸增高造成高尿酸血症，从而导致痛风、心血管病变等系列疾病[1,2]。尿酸酶(uricase,EC1.7.3.3)能够专一催化尿酸氧化成易溶的尿囊素再主要经肾脏排泄。尿酸酶是酶法测定血清尿酸诊断高尿酸血症相关疾病的关键工具酶[3-4]，也是治疗高尿酸血症的候选蛋白质药物，更是当前治疗难治性痛风的唯一有效药物[5-6]。尿酸酶的应用都要求其生理 pH 下比活性高、稳定性好。但现有天然尿酸酶即使在最适条件下比活性都很低，稳定性也有限，尤其现有尿酸酶最适 pH 都偏碱性，在生理 pH 下保留活性都没有超过 60% [1]。所以，热稳定性好、在生理 pH 下比活性更高的尿酸酶有更好应用潜力。

为便于重组表达，微生物是尿酸酶的最重要来源。很早发现，中国微生物菌种保藏中心的酵母细胞株 C.G.M.C.C 2.1008 在尿酸诱导下表达尿酸酶，其热稳定性优良且比活性较高，有显著应用潜力[1]；最有吸引力的是此尿酸酶最适 pH 接近中性，是分子改造提高催化效力的理想起始尿酸酶(数据未发表)。用 DEAE-纤维素反复负吸附纯化后确认纯度满足要求的天然尿酸酶在上海进行 Edman 降解，发现其酶蛋白 N 端被封闭，而进一步串联质谱分析发现其氨基酸序列与已知尿酸酶都显著不同[7]。此前据苛求芽孢杆菌尿酸酶 N 端 Edman 降解所得氨基酸序列，用基因组 DNA 为模板，经简并引物 PCR 成功克隆出其绝大部分编码序列[8]。但糟糕的是，据上海进行串联质谱分析所得肽段的氨基酸序列，用该真菌基因组 DNA 为模板，反复尝试简并引物 PCR，既没有克隆出任何与尿酸酶相似基因序列，也没有克隆出串联质谱分析所发现序列相似蛋白的肽段。为快速克隆获得此真菌尿酸酶编码序列，本文先测定 rRNA 鉴定此菌种确为季也蒙毕赤酵母(*Meyerozyma guilliermondii*)，用制备型 SDS-PAGE 纯化尿酸诱导的天然酶重新进行串联质谱分析发现其氨基酸序列与据季也蒙毕赤酵母基因组序列推定的假定尿酸酶(Uniprot id: A5DFP1)氨基酸序列高度相似，转录组测序发现此序列高效诱导表达；进一步据 A5DFP1 编码序列设计精确引物从 cDNA 经 PCR 克隆出目标基因，并重组表达及与天然酶性质进行比较，确认获得来自此季也蒙毕赤酵母细胞株尿酸酶的编码序列。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒载体

菌株购自于中国微生物菌种保藏中心(C.G.M.C.C 2.1008)。pDE1 及 pDE2 质粒载体来源于定向克隆试剂盒。感受态大肠杆菌 DH5α 及 BL21(DE3)细胞购自于北京鼎国昌盛生物技术公司。

1.1.2 试剂

DNA ladder(DL2000)和 rTaq 酶购自于 TaKaRa 公司，蛋白质 Marker 购自于赛默飞世尔科技有限公司；T 载体试剂盒及定向克隆试剂盒购自于北京擎科新业生物技术有限公司，质粒提取试剂盒购自于美国 OMEGA 公司，真菌 RNA 提取试剂盒及胶回收试剂盒购自于 MAGE 公司，逆转录试剂盒购自于罗氏公司；DEAE-cellulose 52 层析柱和 Ni 柱购自于索莱堡公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 菌种鉴定

适量菌液涂布于麦芽糖浸膏平板上，37℃ 孵箱培养 24h。平板于干冰运输至北京中美泰和生物技术公司和重庆盘点生物科技有限公司分别进行菌种鉴定。

1.2.2 天然尿酸酶的诱导表达及纯化

此酵母经过扩大培养及尿酸诱导后获取天然尿酸酶(MGU)，经 DEAE-cellulose 52 纤维素负吸附纯化 3 次[1]，浓缩，20mM Tris-HCl (pH8.0)透析过夜，取 1.5ml 酶液经超滤管超滤至 300μl。取 25μl 进行 SDS-PAGE。

1.2.3 串联质谱鉴定

SDS-PAGE 后进行考马斯亮蓝染色，脱色充分后将胶上可见的条带依次切下并编号为 1、2、3、4，保存于灭菌的 EP 中。将条带用灭菌后的双蒸水清洗 3 次，送第三军医大学生物医学分析测试中心进行串联质谱鉴定。

1.2.4 转录组测序分析

取尿酸诱导培养后菌液，于干冰运输至上海美吉生物有限公司转录组测序。

1.2.5 尿酸酶基因的扩增

取尿酸诱导后的真菌培养液，用真菌 RNA 提取试剂盒提取 RNA 后进行逆转录得到 cDNA 模板，分装后保存于-20℃。以 Uniprot id A5DFP1 编码序列为模板，针对此蛋白 N 端前 8 个氨基酸残基的编码序列及 C 端含终止密码及以外 21 个碱基的基因组序列，设计第一对精确 PCR 引物(委托北京擎科新业生物技术有限公司合成)；其中正向引物 PF1 序列为 CACCATGTCTTTGGTCGCATCTTCATACG，反向引物 PR1 序列为 TTATAACTTGGCGTTGGCGTCTCTG。再设计第二对精确引物以便 PCR 产物与表达载体连接；正向引物 PF2 为 CACCATGTCTTTGGTCGCATCTTCATACG，反向引物 PR2 为 TAACTTGGCGTTGGCGTCTCTG。PCR 反应体系为 100μl：rTaq 酶 1μl，10×buffer 10μl，$MgCl_2$ 6μl，dNTPmix 8μl，PF1/ PF2 4μl，PR1/ PR2 4μl，再用无菌水补足至 100μl。PCR 参数设置：95℃预变性 3min，95℃变性 30s，60℃退火 30s，72℃延伸 1min，35

个循环后 72℃延伸 5min。PCR 产物用 1.7%的琼脂糖凝胶电泳后，胶回收备用。

1.2.6 T 载体连接测序

将胶回收后的产物根据试剂盒说明连接至 T 载体后转化入 DH5α感受态中，加入不含抗生素的 LB 培养基复苏后取适量菌液涂布于含 100mg/L 氨苄青霉素抗性的 LB 选择平板上筛选转化子，37℃倒置培养过夜。次日挑取单克隆于含 100mg/L 氨苄青霉素抗性的培养基中扩大培养后，送菌液测序。

1.2.7 重组尿酸酶表达质粒的构建

引物 PF1 和 PR1、PF2 和 PR2 能使 PCR 产物带上 CACC 接头，便于与定向克隆表达载体 pDE1 及 pDE2 直接连接。构建的质粒 pDE1-MGU 重组表达后的尿酸酶蛋白 N 端有 6his 标签，pDE2-MGU 重组表达后的尿酸酶蛋白 C 端有 6his 标签，pDE1-MGU 送至北京泰和基因有限公司进行突变去掉 N 端 6his 标签及连接肽序列构建不带 6his 标签的重组尿酸酶质粒 R-MGU。将上述质粒采用 42℃热激法转化入大肠杆菌感受态 DH5α中，在含卡那霉素抗性的 LB 平板上筛选转化子，37℃倒置培养过夜。次日挑阳性克隆进行菌落 PCR 鉴定，并扩大培养后用质粒提取试剂盒提取质粒，于-20℃中保存待用。

1.2.8 重组尿酸酶的诱导表达

将重组尿酸酶质粒经 42℃热激法转化大肠杆菌感受态 BL21(DE3)，于含有 100mg/L 卡那霉素抗性的 LB 选择平板上筛选转化子，37℃倒置培养过夜。次日分别挑取单克隆接种到含卡那霉素的 3ml 培养基中，37℃ 180rpm 摇床培养过夜后按 1：1000 比例接种至新的 250ml 培养基中。37℃ 180rpm 摇床培养至菌液 OD_{600} 达到 0.6～1.0 时，加入终浓度为 0.2mmol/L 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG)，16℃ 110rpm 摇床培养 20～22h。4℃ 8000rpm 离心 15min 收集菌体。用 20mmol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液重悬菌体，冰浴下超声波碎菌(超声振幅 33%，工作时间 5s，间隔时间 5s，超声 30min)。4℃ 12000rpm 离心 20min 离心破碎菌液，分别收集上清液即为粗酶液。

1.2.9 重组尿酸酶的纯化

N 端和 C 端带有 6his 标签的重组尿酸酶蛋白用镍柱纯化。收集 300mmol/L 咪唑洗脱的洗脱液即为纯化一次的酶液。重复镍柱纯化一次，收集目的蛋白洗脱液保存于 4℃。重组表达后无 6his 标签尿酸酶蛋白等电点约为 8.97，故根据负吸附原理采用 DEAE-cellulose 52 层析柱纯化。将粗酶液上样于经 20mmol/L Tris-HCl(pH8.0)缓冲液平衡的 DEAE-cellulose 52 层析柱，控制流速为 5～7s/滴，吸附完成后，用平衡缓冲液洗涤/洗脱层析柱。同时每管 1～2 ml 收集洗涤洗脱液。测定洗脱液中尿酸酶活力，合并活力

最高部分。重复 DEAE-cellulose 52 层析柱纯化一次，收集目的蛋白保存于 4℃。

1.2.10 重组尿酸酶的表征

取适量酶液进行 10%的 SDS-PAGE。尿酸酶为底物测定尿酸酶活力[9-10]，考马斯亮蓝法测其蛋白浓度以计算比活性。双倒数分析法测定米氏常数(K_m)[11]。测定酶活性抑制率对抑制剂浓度对数的响应，用 MS Excel 6.0 内嵌函数拟合线性部分确定半抑制浓度(IC_{50})，根据不同重组尿酸酶 K_m 换算竞争性抑制剂氧嗪酸钾和黄嘌呤的抑制常数。取纯化后的尿酸酶滤菌后，分别加至滤菌的 pH7.4 磷酸盐缓冲液及 pH9.2 硼砂缓冲液中测定热稳定性(热稳定性测定体系含终浓度为 0.1 g/mL 的氨苄霉素和卡那霉素、0.1 mmol/L EDTA、2.0 mmol/L 对氨基苯甲脒二磷酸盐)。同时分别考察终浓度为 30 μmol/L 的抑制剂氧嗪酸钾对其热稳定性的影响。将稳定性测定体系置于 37℃恒温细胞培养箱中，20 分钟后超净台取样测定初始活性，然后间隔不同时间测定活性记录活性衰减过程。将离子交换负吸附纯化后的天然尿酸酶 MGU 和重组尿酸酶 R-MGU 再进行酸性非变性电泳后胶回收[7]，样品用超滤管浓缩脱盐后送至第三军医大学生物分析测试中心进行 MODLI-TOF-MS 检测其分子量进行比较。

2 结果

2.1 MGU 的编码序列片段信息

酵母菌 C.G.M.C.C 2.1008 尿酸酶 (MGU，以下指来自此细胞株的尿酸酶)需尿酸诱导表达[1,7]，其最大优势是最适 pH 接近中性(数据未发表)。获得酶蛋白部分肽段或编码基因序列就能用简并引物 PCR 或筛选 cDNA 快速克隆其完整编码序列[8]。将 MGU 纯化到 HPLC 显示为单一肽段后，Edman 降解测序发现其 N 端被封闭，用胰蛋白酶解后串联质谱分析肽段序列发现其序列与已知真菌尿酸酶相差都很大，但与一种特殊脱氢酶氨基酸序列相似(完成于上海)[7]。据此相似蛋白肽段序列设计简并引物用于以基因组 DNA 为模板经 PCR 扩增其编码序列，但没有获得任何有意义的序列信息。所以，迫切需其它路线快速确定 MGU 的部分氨基酸序列甚至部分编码序列，以便快速克隆其基因。

Uniprot 数据库中有季也蒙毕赤酵母 ATCC6260 基因组序列推断的假定尿酸酶 A5DFP1，但没有进行重组表达确认。为尽快确认 MGU 与尿酸酶 A5DFP1 氨基酸序列相似性，先测定 rRNA 序列鉴定菌种，结果发现该细胞属于季也蒙毕赤酵母，但无法确定到细胞株(其 28S rRNA 序列 D1/D2 区和 ITS 区序列分别见 Genbank 登录号 *KY688098* 和 *KY688099*)。首次串联质谱发现 MGU 氨基酸序列与 A5DFP1 无明显相似性，有可能

源自未知实验环节出错。该酵母菌细胞用尿酸诱导表达天然 MGU 后，用 DEAE-cellulose 52 柱层析纯化三次，再用 SDS-PAGE 分辨出四个蛋白成分进行串联质谱分析(图 1)，发现分子量由大到小四种多肽对应的最相似蛋白分别为 A5DJ39、A5DR94、A5DFP1、A5DNM4。其中，A5DJ39 为甲酸脱氢酶；A5DR94 为一种未表征过的蛋白，结构域预测其有水解酶活性；A5DNM4 为肽基脯氨酰顺式反式异构酶。意外的是，最高丰度成分 3 胰蛋白酶水解后，串联质谱解析成功的所有高丰度肽段都在季也蒙毕赤酵母尿酸酶 A5DFP1 氨基酸序列中找到全同肽段，这些高丰度肽段合并已覆盖 A5DFP1 氨基酸序列中近 90%区域(图 2)，即使部分低丰度肽段也能与 A5DFP1 的肽段序列匹配。用 MALDI-TOF-MS 发现 MGU 肽段分子量约 17.4kDa，而 SDS-PAGE 分析肽段分子量约 35kDa[1,7]，但按 A5DFP1 氨基酸序列计算的肽段分子量约 33.8kDa[1,7]。所以，MGU 与 A5DFP1 序列高度相似，但 MGU 肽段可能更长或者存在化学修饰。

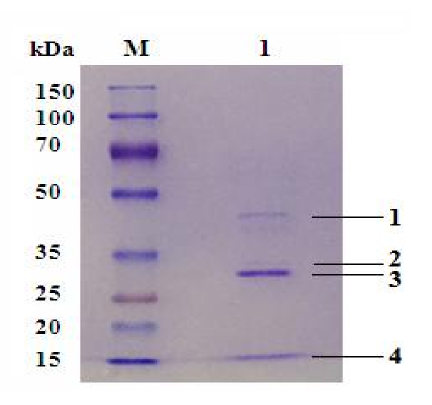


图 1 天然季也蒙毕赤酵母尿酸酶 SDS-PAGE

Fig.1 SDS-PAGE for MGU

M: Protein maker 1: Purified MGU

```
             10          20          30          40          50
1  MSLVASSYGK GNVKFLKVKK NPSNPKEQDI LQANVQVLLR GNFDISYTKA
2                             EQDI LQANVQVLLR GNFDISYTKA
             60          70          80          90         100
1  DNSPIVPTDT VKNTVLVEAK TTDVWPIERF AAHLAKHFIN KYSHVSGIEI
2  DNSPIVPTDT VKNTVLVEAK TTDVWPIERF AAHLAK       YSHVSGIEI
            110         120         130         140         150
1  TIQQARWTRF DVNGKPHAHS FRHDGPETRN TYLNYDRSGK LVLESSIKDL
2  TIQQAR       F DVNGKPHAHS FR          N TYLNYDR    LVLESSIK
            160         170         180         190         200
1  TVLKSTGSMF YGYNVCDYTT LKPTKDRILS TSVASTWTFD PKKVSTLDDV
2      STGSmF YGYNVcDYTT LKPTK   ILS TSVASTWTFD  KKVSTLDDV
            210         220         230         240         250
1  FKAADKGLFD NTYDAARNTT LELFALENSP SVQATMYNMS TKILKLVPEV
2  FK     GLFD NTYDAARNTT LELFALENSP SVQATmYNmS TK    LVPEV
            260         270         280         290         301
1  SKVDYVLPNI HFVLFDLKWK GIESNDELFY PSSDPNGLIK STVARDANAKL
2  SKVDYVLPNI HFVLFDLK   GIESNDELFY PSSDPNGLIK
```

图 2 串联质谱解析 MGU 肽段与 A5DFP1 氨基酸序列的比对

Fig.2Alignment for amino acid sequence of A5DFP1 and MGU peptides by MS/MS

1: amino acid sequence of A5DFP1 2: Peptides by MS/MS

为确认 A5DFP1 氨基酸序列与 MGU 序列的相似度，进一步进行转录组测序。MGU 依赖于尿酸诱导表达[1,7]。转录组测序得到两个编码片段的 read 与基因 PGUG_02092 的 DNA 序列对应完全一致，其转录本 EDK37994 与 A5DFP1 完全一致，且表达量很高(fpkm 位列第 11) (图 3)。可见，酵母菌 C.G.M.C.C 2.1008 诱导型尿酸酶 MGU 氨基酸序列与 A5DFP1 高度相似，应该可用 PCR 从其 cDNA 中快速克隆其绝大部分编码序列。

Gene_id	FPKM	Corresponding coding proteins
PGUG_05146	42480.36	Uncharacterized protein
PGUG_01317	24273.03	Glyceraldehyde-3-phosphate
PGUG_01281	13819.3	Uncharacterized protein
PGUG_02467	13741.76	Uncharacterized protein
PGUG_05240	11591.21	Uncharacterized protein
PGUG_04211	11380.11	Thiamine thiazole synthase
PGUG_02339	11239.49	Uncharacterized protein
PGUG_03175	10839.14	Uncharacterized protein
PGUG_02619	9402.94	Uncharacterized protein
PGUG_04391	9334.39	Enolase 1
PGUG_02092	**7907.96**	**transcript:EDK37994**
PGUG_03553	5668.4	Uncharacterized protein
PGUG_01560	5662.73	Respiratory growth induced protein 1
PGUG_02623	5189.02	Uncharacterized protein
PGUG_01083	5157.03	Glutamine synthetase

(a)

```
PGUG_02092.seq ATGTCTTTGGTCGCATCTTCATACGGAAAGGGAAACGTCAAGTTC 45
read1.seq                       TTCATACGGAAAGGGAAACGTCAAGTTC 28

PGUG_02092.seq TTAAAAGTCAAGAAAAATCCTAGCAATCCAAAAGAACAAGATATT 90
read1.seq      TTAAAAGTCAAGAAAAATCCTAGCAATCCAAAAGAACAAGATATT 73

PGUG_02092.seq CTTCAAGCAAATGTTCAGGTGTTATTAAGAGGAAATTTTGATATT 135
read1.seq      CTTCAAGCAAATGTTCAGGTGTTATTAAGAGGAAATTTTGATATT 118

PGUG_02092.seq TCATATACCAAAGCAGACAACTCACCAATTGTTCCAACTGAT······ 180
read1.seq      TCATATACCAAAGCAGACAACTCACCAATTGTT 151
```

(b)

```
PGUG_02092.seq ······ ATTGAGAGATTTGCGGCTCATTTAGCTAAGCATTTCATCAAC 270
read2.seq                    GGCTCATTTAGCTAAGCATTTCATCAAC 28

PGUG_02092.seq AAGTACTCTCATGTTTCCGGAATCGAAATCACTATTCAGCAAGCT 315
read2.seq      AAGTACTCTCATGTTTCCGGAATCGAAATCACTATTCAGCAAGCT 73

PGUG_02092.seq AGATGGACTCGTTTTGATGTCAATGGTAAGCCACATGCCCATTCT 360
read2.seq      AGATGGACTCGTTTTGATGTCAATGGTAAGCCACATGCCCATTCT 118

PGUG_02092.seq TTCCGCCACGATGGCCCAGAAACCAGAAACACTTATTTGAAC······ 405
read2.seq      TTC 121
```

(c)

图 3 转录组测序验证目的基因

Fig.3 Confirmation of the target gene by RNA-seq

(a): Fpkm of the transcript EDK37994 (b): Alignment of PGUG_02092 and read1

(c): Alignment of PGUG_02092 and read2

2.2 从 cDNA 中克隆 MGU 的编码序列

以 cDNA 为模板，据 A5DFP1 蛋白 N 端前 8 个残基编码序列和 C 端终止密码及其后基因组序列设计精确引物，PCR 扩增直接获得唯一 900bp 左右产物 (图 4)。

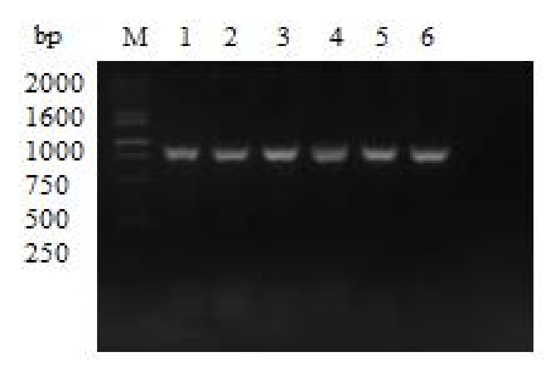


图 4PCR 产物及阳性克隆的琼脂糖凝胶电泳

Fig.4 Agarose gel electrophoresis for the PCR product and positive monoclone

M: Maker DL2000 1：PCR product of the primer PF1/PR1 2：PCR product of the primer PF2/PR2

3～4：Positive clones bearing N-6his5～6：Positive clones bearing C-6his

将胶回收纯化 PCR 产物连接至 T 载体用通用引物测序，发现其与 A5DFP1 编码序列仅有第 435 位碱基不同；A5DFP1 中此位置为 G，而在此 C.G.M.C.C 2.1008 酵母菌中为 C，但对应氨基酸序列仍相同(详见 Genbank 登录号 KY706244.1)。重复用 cDNA 为模板再次 PCR 扩增后测序确认该位点仍为 C。用基因组 DNA 和相同引物扩增，所得 PCR 产物序列也一致。将 PCR 复性温度升高 3 摄氏度，仍然获得相同的唯一 PCR 产物(数据未给)。MALDI-TOF-MS 测定天然酶分子量与按 A5DFP1 氨基酸序列推算相差近 1.0 kDa，但天然 MGU 的 N 端被封闭而无法 Edman 降解测序。因此，此 MGU 氨基酸序列可能除了 N 端外应与 A5DFP1 氨基酸序列相同，或天然酶有较大体积的修饰基团。

2.3 MGU 的重组表达和表征

初步用 5'-RACE 扩增 MGU 的 N 端未知编码序列未获得有意义新序列。真菌尿酸酶的重组表达较为容易，故先重组表达考察产物与天然 MGU 是否有相同性质。真核尿酸酶适合用 6His 标签融合表达以方便纯化[12]。同时尿酸酶多肽链两端参与构成了活性中心[13]；在此真菌尿酸酶任一端添加 6His 标签可能显著降低其活性，但无法确认是因为添加标签肽造成活性下降，还是克隆出错或 N 端编码序列不全使所得尿酸酶活性下降。所以，分别设计了 N 端、C 端带 6His 标签，及无标签的表达载体进行表达并比较。

三种形式的 MGU 诱导表达后都有显著的尿酸酶活性(大肠杆菌宿主细胞无内源尿酸酶活性)。将重组尿酸酶 pDE1-MGU 和 pDE2-MGU 经镍柱纯化；无标签 R-MGU 经两次 DEAE 纤维素柱层析纯化后，再用 SDS-PAGE 比较。结果发现三种表达载体所得肽段分子量相差很小(图 5)。R-MGU 经 DEAE 纤维素柱层析纯化效果太差。但参照此前酸性电泳分离 MGU 的条件[7]，用非变性酸性电泳获得高纯度肽段却都没有尿酸酶活性。

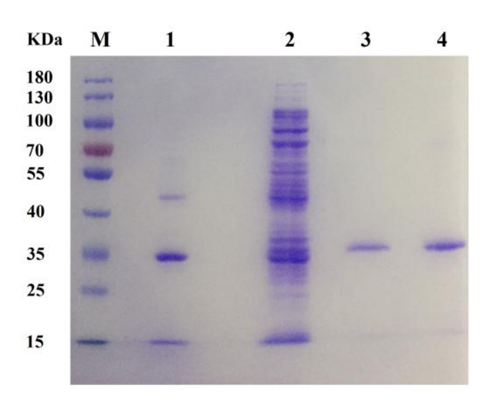


图 5 天然及重组尿酸酶 SDS-PAGE

Fig.5 SDS-PAGE for MGU and recombined uricases

M: Protein maker 1: MGU 2: R-MGU 3: pDE1-MGU 4: pDE2-MGU

测定三种形式重组 MGU 的酶学性质，发现三者比活性差异显著(表 1)，但显然这主要来自纯化效果差异。三者 K_m 无显著差异(表 2)。氧嗪酸钾和黄嘌呤是 MGU 的代表性强竞争性抑制剂[1,7]；三种重组尿酸酶对这两种竞争性抑制剂的敏感性也无显著差异(表 2)。令人惊喜的是，尿酸酶三种重组表达形式在 pH 7.4 时活性都比在 pH 9.2 时更高，与天然 MGU 一样表现为最适 pH 接近中性。

表 1 天然及重组尿酸酶的最大比活性及其 pH 效应 ((U/mg, $\bar{x}$± SD, n = 3)

Table 1 Maximum specific activity of MGU and recombined uricase, and the effects of pH

尿酸酶	pH 9.2 最大比活性	pH 9.2 对 pH 7.4 活性的比值
MGU	4.3 ± 0.3 [1]	62%
pDE1-MGU	6.6± 0.1	80%
pDE2-MGU	4.9 ± 0.2	57%
R-MGU	0.4± 0.1	66%

[1] 表示来自文献[1]的数据。

表 2 天然及重组尿酸酶的米氏常数及抑制常数(μmol/l, $\bar{x}$± SD, n = 3)

Table2 K_m and K_i of MGU and recombined uricases

尿酸酶	pH 7.4			pH 9.2		
	K_m	氧嗪酸钾 K_i	黄嘌呤 K_i	K_m	氧嗪酸钾 K_i	黄嘌呤 K_i
MGU	42± 4	(3.0± 0.8)×10^{-2}	4 ± 1	31 ± 4	1.4± 0.2	7.5 ± 0.3
pDE1-MGU	31 ± 4	(2.0± 0.6)×10^{-2}	5.7± 0.2	33 ± 2	1.8± 0.3	2.7 ± 0.3
pDE2-MGU	35 ± 2	(1.0± 0.1)×10^{-2}	3.3± 0.3	38 ± 4	2.6± 0.3	4.3± 0.4
R-MGU	30 ± 3	(2.2± 0.1)×10^{-2}	3.9 ± 0.4	28 ± 4	1.4± 0.2	3.5 ± 0.2

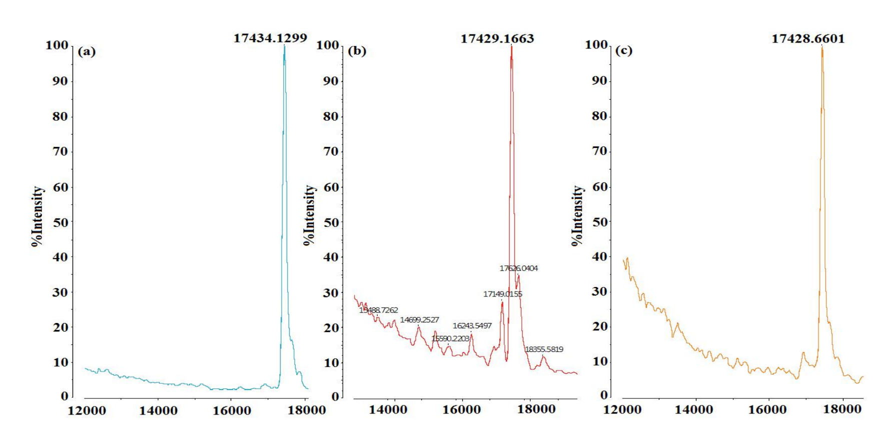


图 6. MALDI-TOF-MS 比较天然 MGU 及重组 R-MGU 的分子量

Fig.6 Comparison of molecular weightsofMGU, R-MGU and their mixture

(a): MGU (b): R-MGU (c): mixture of MGU and R-MGU

分别用制备型酸性电泳纯化 R-MGU 和天然 MGU 至单一蛋白带[7]，再比较其分子大小。在相同 MALDI-TOF-MS 设备用相同校准品测定天然 MGU 和 R-MGU 肽段分子量；天然 MGU 分子量为 17.434KDa，而 R-MGU 分子量为 17.429 KDa (图 6)，二者的差别在 MALDI-TOF-MS 测量误差范围内。特殊的是，将 MGU 和 R-MGU 基本等量混合后再用 MALDI-TOF-MS 测定分子量时，仍然得到单峰且肽段分子量为 17.428。可见，重组表达的无标签 R-MGU 和天然 MGU 氨基酸序列和化学修饰可能都相同。

天然 MGU 在 pH 7.4 加氧嗪酸钾及在 pH 9.2 时热失活初期都出现活性基本不降的平台[7]，三种重组表达形式在热失活初期都无这种平台期(图 7)。在 pH 7.4，无配体时重组 R-MGU 的热失活半衰期比天然 MGU 短，但有配体时半衰期基本无差异；在 pH 9.2，无配体时 C 端带 6His MGU 热失活半衰期显著短于天然 MGU，但有配体时差距减弱。

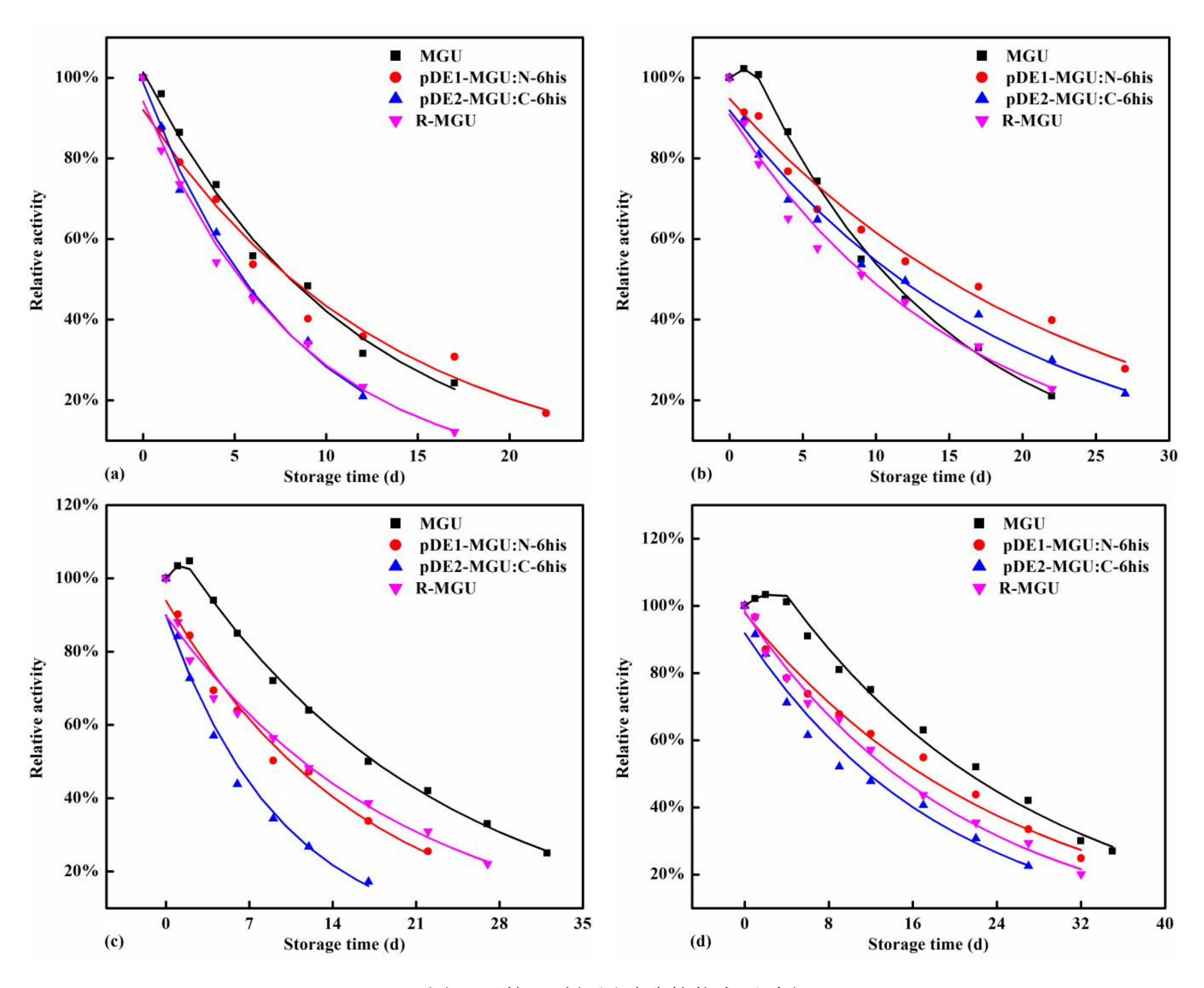


图 7 天然及重组尿酸酶的热失活过程

Fig.7 Thermoinactivation processes for MGU andthe recombined uricases

(a): pH 7.4 (b): pH 7.4 plus oxonate (c): pH 9.2(d): pH 9.2 plus oxonate

3 讨论

图 5 及表 1 结果表明无标签 R-MGU 在大肠杆菌中重组表达后比在天然宿主细胞中更难纯化[1,7]，可能大肠杆菌宿主细胞中有较多等电点相近的蛋白。文献报道用 6His 标签成功表达真核尿酸酶[12]。但尿酸酶 N 端和 C 端序列显著影响其活性和热稳定性[13]。比较在 N 端和 C 端添加 6His 标签的重组表达 MGU 表明，6His 标签添加到 N 端或 C 端对其最大活性和对底物亲和力等性质影响较小(表 1 和表 2)，特别是其活性的 pH 效应未显著改变(数据未给)。可见，MGU 适合用 6His 标签融合表达以便于快速纯化。

SDS-PAGE 分析天然及重组 R-MGU 蛋白分子量均在 35KDa 左右，但可能由于多肽在 MALDI-TOF-MS 时带有两个正电荷故其肽链分子量接近 17.4 KDa。总体而言，本文结果支持天然 MGU 氨基酸序列与在大肠杆菌中按 A5DFP1 氨基酸序列重组表达的 R-MGU 一致。Edman 降解测序时发现其肽链的 N 端封闭[7]，表明其存在 N 端化学修饰。多次用 MALDI-TOF-MS 测定所得 MGU 肽段的分子量都比按 A5DFP1 氨基酸序列计算分子量大接近 1.0 kDa；如此大差距不可能来自实验测定误差。球形节杆菌尿酸酶的 N 端有超出其链间 β -折叠的短肽段，该酶的热稳定性非常优良[13-16]。苛求芽孢杆菌尿酸酶的 N 端和 C 端序列缺失都会造成其热稳定性显著下降[13, 17-18]。所以，可能天然 MGU 有特殊修饰并且此修饰与其热稳定性相关；R-MGU 能再现天然 MGU 的 N 端修饰，为鉴定其化学修饰及此修饰在 MGU 酶学性质中的意义奠定了基础。

医药用酶的价值依赖于其比活性及热稳定性。三种重组 MGU 热稳定性在 pH 7.4 与天然 MGU 差距很小，但在 pH 9.2 差距增大（图 7）。可能 N 端或 C 端 6His 标签影响重组 MGU 热稳定性。R-MGU 纯度低，污染蛋白酶对蛋白降解肯定会降低 R-MGU 热稳定性。现有尿酸酶最适 pH 都偏碱，降低了其作为诊断工具酶及药用酶的价值。MGU 是至今发现的第一个最适 pH 接近中性的尿酸酶，解析其最适 pH 的决定因素，对研制在生理条件下活性更高的药用尿酸酶、适合双试剂法测定血清尿酸的诊断工具酶[16]，无疑都有重要价值。MGU 存在还未鉴定的化学修饰，且该修饰可能与其最适 pH 及热稳定性有关；解析其化学修饰本质及在此酶最适 pH 及热稳定性中的意义、并解析其最适 pH 的决定因素，是下一步的研究重点。首次在上海委托串联质谱分析所得 MGU 肽段信息，误导了 MGU 编码序列克隆的方向；多角度交叉验证是获得可靠实验结果的必要途径。正是基于多角度交叉验证 MGU 与 A5DFP1 的序列相似性，本文才能快速确认来自细胞株 C.G.M.C.C 2.1008 最适 pH 为中性尿酸酶的编码序列，为后续研究奠定基础。

参考文献

[1] 武文明，曾昭淳,李小彦，等．产朊假丝酵母尿酸酶的纯化和特性研究．西南大学学报(自然科学版), 2008, 30(3):84-89.

Wu W M, Zeng Z C, Li X Y,et al. Purification and characterization of the uricase from *Candida utilis*.Journal of southwest university (Natural science edition),2008, 30(3):84-89.

[2] Ishizaka N, Ishizaka Y, Toda E, et al. Association between serum uric acid, metabolic syndrome, and carotid athero-sclerosis in Japanese individuals. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(5):1038-1044.

[3]Duncan P, Gochman N, Bayse D, et al. A candidate reference method for uric acid in serum. II. Interlaboratory testing. Clinical Chemistry, 1982, 28(2):291-293.

[4] Koyama Y, Ichikawa T, Nakano E. Cloning, Sequence Analysis, and Expression in Escherichia coli of the Gene Encoding the *Candida utilis* Urate Oxidase (Uricase). Journal of Biochemistry, 1996, 120(5):969-973.

[5] Pui C H,Relling M V, Lascombes F, et al. Urate oxidase in prevention and treatment of hyperuricemia associated with lymphoid malignancies.Leukemia, 1997,11(11):1813-1816.

[6] 朱献军，刘建国，黎高翔.尿酸氧化酶基因的克隆、表达及其产物的应用.生物工程学报，2001, 17(1):68-72.

Zhu X J, Liu J G, Li G X.Cloning and expression of urate oxidase and its application in serum uric acid analysis.Chinese Journal of Biotechnology,2001, 17(1): 68-72.

[7]Wu J, Yang X, Wang D, et al. A numerical approach for kinetic analysis of the nonexponential thermoinactivation process of uricase.Protein Journal, 2016, 35(4):1-12.

[8]赵运胜,卜友泉,廖飞．用简并引物快速克隆苛求芽孢杆菌尿酸酶的编码序列.重庆医科大学学报,2017,42(02):219-224.

Zhao Y S, Bu Y Q,Liao F.Rapid cloning gene sequence of the uricase from Bacillus fastidiousby degenerated primer. J Chongqing Med Univ,2017, 42(02): 219-224.

[9] 赵运胜，赵利娜，杨根庆,等．苛求芽孢杆菌胞外尿酸酶的表征及其在血清尿酸测定中的应用.华中科技大学学报(医学版), 2007,36(2):239-242.

Zhao Y S, Zhao L N, Yang G Q,et al. Characterization of an extracellular uricase from *Bacillusfastidious* and its application in direct kinetic assay of serum uric acid. Acta Med Univ Sci Technol Huazhong,2007, 36(2): 239-242.

[10] Liao F, Zhu X Y, Wang Y M, et al. The comparison of the estimation of enzyme kinetic parameters by fitting reaction curve to the integrated Michaelis-Menten rate equations of different predictor variables. Journal of Biochemical & Biophysical Methods, 2005, 62(1):13-24.

[11] Liu X, Wen M, Li J, et al. High-yield expression, purification, characterization, and structure determination of tag-free *Candida utilis* uricase. Applied Microbiology & Biotechnology, 2011, 92(3):529-537

[12]吴双林，陈斌，刘成倩,等．猪尿酸氧化酶在大肠杆菌中的表达、纯化与部分酶学性质分析.生物工程学报, 2009, 25(11):1664-1670.

Wu SH L, Chen B, Liu CH Q, et al. Expression in*Escherichia coli*, purification and enzymatic properties of porcine urate oxidase. Chin J Biotech, 2009, 25(11):1664-1670.

[13]Feng J, Wang L, Liu H, et al. Crystal structure of Bacillus fastidious uricase reveals an unexpected folding of the C-terminus residues crucial for thermostability under physiological conditions. Applied Microbiology &

Biotechnology, 2015, 99(19):7973-7986.

[14] 陈丹，韩晶，史洪娜,等. 球形节杆菌尿酸酶的表达、纯化及其活性.中国生物制品学杂志, 2014, 27(3):351-355.

Chen D, Han J, Shi H N,et al. Expression, purification and activity of *Arthrobacter globiformis* uricase.Chinese Journal ofBiologicals,2014, 27(3): 351-355.

[15] Suzuki K, Sakasegawa S I, Misaki H, et al. Molecular cloning and expression of uricase gene from *Arthrobacter globiformis*in Escherichia coli and characterization of the gene product. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2004, 98(3):153-158.

[16] Huang Y, Chen Y, Yang X, et al. Optimization of pH values to formulate the bireagent kit for serum uric acid assay. Biotechnology & Applied Biochemistry, 2015, 62(1):137.

[17] Zhang C, Yang X, Feng J, Yuan Y, Li X, Bu Y, Xie Y, Yuan H, Liao F. Effects of modification of amino groups with poly(ethylene glycol) on a recombinant uricase from *Bacillus fastidiosus*. Biosci Biotechnol Biochem. 2010; 74(6):1298-1301.

[18] Zhang C, Yang X, Gao A, Hu X, Pu J, Liu H, Feng J, Liao J, Li Y, Liao F. Comparison of modification of a bacterial uricase with N-hydroxysuccinimide esters of succinate and carbonate of monomethoxyl poly(ethylene glycol). Biotechnol Appl Biochem. 2014; 61(6):683-690.

Clone, Expression and Characterization of the Uricase from *Meyerozyma Guilliermondii*

RAO Jing-jing[1] JING Yi-xian[1] ZOU Ming-yue[1] HU Xiao-lei[1]
LIAO Fei[1] YANG Xiao-lan[1,*]

(Key Laboratory of Clinical Laboratory Diagnostics of the Education Ministry, College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract Objective: To clone the uricase gene of the *Meyerozyma guilliermondii*(C.G.M.C.C 2.1008) for recombinant expression in*Escherichia coli*and further characterization. Methods: The strain was identified by sequences of 28s rRNA D1/D2 and ITS. Partial peptide sequences were recognized through trypsin digestion and MS/MS analyses. The induction expression of the uricase was verified by RNA-seq. The target gene was amplified by PCR through precise primers designed according to the coding sequence of a homologus putative uricase of *Meyerozyma guilliermondii*ATCC 6260. The cloned coding sequence was inserted into the expression vectors pDE1 and pDE2 to construct the plasmids pDE1-MGU and pDE2-MGU bearing 6His tags. After the deletion of 6His tag and the linking peptide, the vector for the non-tagged MGU was constructed and denoted R-MGU. The plasmids were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) for induced expression. The recombinant protein was characterizedby SDS-PAGE, MALDI-TOF-MSand the related enzymatic properties. Result: The sequences of rRNA supported that it was a strain of *Meyerozyma guilliermondii*. MS/MS analyses supported its high homology to a putative

uricase A5DFP1 deduced from the genomic sequence of *Meyerozyma guilliermondii*ATCC 6260 and its induced expression by uric acid was further verified by RNA-seq. After PCR cloning with a pair of precise primers, the coding sequence of the targeted MGU showed the only different base at the 435th site but gave the same amino acid residue. After recombinant expression, R-MGU had the peptide weight of about 35KDa by SDS-PAGE, but of 17.43 by MALDI-TOF-MS that was consistent with that of the wildtype, supporting the unidentified chemical modification of MGU. The maximum specific activity of the recombinant form of the uricase was about 6.0U/mg. Of R-MGU, the K_m, K_i of representative inhibitors and molecular weight had no significantly differences from the wildtype. However, the thermostability of R-MGU was slightly worse than the wildtype, due primarily to the low purity of the sample. Conclusion: From *Meyerozyma guilliermondii*(C.G.M.C.C 2.1008), MGU gene was cloned and expressed successfully as the active enzyme in *Escherichia coli*.

Key words *Meyerozyma guilliermondii* uricase gene cloning recombinant expression characterization